第4卷第2期　　动物学研究　　Vol. 4, No. 2
1983年6月　　ZOOLOGICAL RESEARCH　　May., 1983

体外培养哺乳类细胞去核的研究

杨晓峰　郭　仁　庄俊英　张新生　徐维明

（中国医学科学院医学生物学研究所，昆明）

引　言

为了研究细胞核和质这两个主要部分的各自独立又相互协调的作用，人们常设想把细胞核从细胞质中分离出来，或者用再重新加以组合的方法来进行此项研究。这样就需要一种在生理条件下进行核质分离的技术。自从1939年Commandon等最先成功地进行去核和核移植实验以来，一直是倚仗显微操作术进行这样的工作。这种去核方法所能进行的工作是非常有限的。

1967年，英国Carter发现自一种真菌*H. dematioideum*培养物中分离到的代谢物，能诱发小鼠L细胞的去核以及其它的一些生物学校应。这种物质名为细胞松驰素（Cytochalasin B）。然而，细胞松驰素B所诱发的哺乳类细胞的去核率低，不能提供大量无核细胞。Prescott等于1972年，发展了一种应用细胞松驰素B作用结合离心术获得高比率去核细胞的方法，从而为真核细胞核质关系、核质在病毒感染时各自的作用以及细胞拆合工程等项研究提供了一个有价值的工具。

目前这项技术开始在国内引起注意，几个实验室已进行了初步的去核技术研究工作。为对建立此项技术积累经验，我们选用了五种国内实验室常用细胞进行了去核条件的探讨，并对去核细胞的一些生物学性质进行了相应的观察，现将结果报告如下：

材料和方法

细胞松驰素B的配制：将细胞松驰素B（以下简称CB）（Sigma化学公司产品，10毫克/并）溶于10毫升二甲基亚砜中，制成1毫克CB/1毫升二甲基砜的备用液，于4℃保存。

细胞：两种正常二倍体细胞，即次代恒河猴肾细胞和KMB_{17}人胚肺二倍体细胞株，三种传代细胞系为：Hela细胞，宫—743宫颈癌传代细胞，人胚肾传代细胞（昆明军区医学科学研究所赠给）。上述细胞均生长于自制塑料或玻璃载片上，这些载片放在含生长

本文1982年3月29日收到。

本文承蒙中国科学院昆明动物研究所李靖炎付研究员和吴鹏夫先生审阅，特此致谢。

液的平皿中。细胞生长液为199培养液，其中补加10%小牛血清和适量青、链霉素，用$NaHCO_3$调pH至7.2。然后放于含5%CO_2的孵箱内静置培养。

去核步骤：将予热至37°C的10毫升含一定浓度CB的细胞营养液(或含0.5—1%的DMSO的营养液作为对照)，加入离心管内，取一个自制支架放入已装液的离心管底部，将长有细胞的载片放于支架上，细胞面朝离心管底部，平衡后，加盖，放37°C孵箱中预处理2小时。与此同时，将VAC—60超速离心机175角转头和离心腔分别预热至37°C和30°C，预处理后按实验要求的速度及时间离心。此后，取出细胞载片放入平皿中，细胞面朝上，加入无CB的营养液，让其恢复形态半小时以上，用甲醇固定，Giemsa染色，在显微镜下观察细胞去核情况，并连续计数500个细胞，求出去核细胞的百分率。

去核细胞中DNA合成的测定：将去核细胞载片放入平皿中，加入1μci/ml ^3H胸腺嘧啶核苷的含30%小牛血清的MEM，在37°C 5%CO_2孵箱中温育20小时，去除标记液，用无色冷PBS洗涤一次，5%冷三氯醋酸消化四次，用丙酮脱水一次，空气干燥，将一载片放入一闪烁杯底部，细胞面朝上，加入闪烁液，在FJ—353液体闪烁计数器中测定，同时设置去核及正常细胞不标记、去核及正常细胞标记、空白闪烁液及与孵育细胞同量的^3H胸苷等四个对照组。

去核细胞及核体电镜标本的制备：对KMB_{17}细胞进行去核后，将离心管中的培养液，经低速离心从离心管底部收集从细胞中脱出的细胞核，此外，将去核细胞载片放入无CB的常规培养液中，30分钟后，将去核细胞（胞质体）从载片上刮下，低速离心收集，与如上收集的游离细胞核（胞核体）分别固定和制片。醋酸双氧铀和枸橼酸铅染色，在$D\times B_2$—12型透射电子显微镜下观察。

结 果

（一）培养细胞去核条件观察

1. CB浓度对细胞去核率的影响

不同的细胞对CB的敏感性可能不同，当固定适当的离心速度（14,000转／分）等条件时，我们观察了不同的CB浓度（每毫升培养液中分别含5、7、9、10、20微克的CB）对5种细胞去核效率的影响，结果（见表1）发现：（1）一般情况下，随着CB浓度的增高，细胞去核效率也增加，尤其是次代猴肾细胞较为明显；（2）当CB浓度增加到一定时（如20μg/ml），在同样离心速度下，多数细胞从载片上脱落下来，细胞形态也有较明显的影响。其中KMB_{17}人二倍体细胞更为敏感，在10μg/ml的CB浓度时，即可引起较严重的细胞脱落。这说明当CB浓度高于此限度时即不适于获得较大量的去核细胞；（3）不同细胞株系去核时所需要的CB浓度也略有差异，如KMB_{17}人二倍体细胞在5μg/ml时即可达到98%的去核效率，Hela细胞与宫—743细胞则在7μg/ml时去核效率很好，而人胚肾传代细胞系则需要9—10μg/ml的CB浓度。

2. 离心速度和时间对细胞去核的影响

离心速度是去核技术中的第二位的因素。在适宜的CB浓度等条件下，我们检查了离心速度的作用。结果列于表2，从中可看出，离心速度一般不宜超过20,000转/分，

此时多数细胞开始有严重脱落，且不能更多地提高细胞去核效率，还不使去核细胞受损伤，其中例外者是次代猴肾细胞，它对载片的贴附力强，在此速度时未见大片脱落，细胞去核效率提高到72%。如果采用较低的离心速度（8,000转/分），除宫743外，其他类型细胞的去核率明显下降。以KMB_{17}为例，当以8,000转/分的速度、加大CB浓度至20μg/ml时，去核效率也只能达到60%左右。从我们所得结果来看，一般细胞离心以12,000—15,000转/分（相对离心力约为13,000—20,000×g）较为适宜。

表1 细胞松弛素的浓度对细胞去核效率的影响

细胞株名	去核率（%）				
	细胞松弛素B的浓度（μg/ml）				
	5	7	9	10	20
次代猴肾细胞	32.9	41.1	47.9	61.2	62.6
KMB_{17}人二倍体细胞	98.0	98.5	99.0	**	**
Hela	79.7	91.0	68.0	63.0	**
宫743	59.5	79.0	70.0	72.0	**
人胚肾传代细胞系	54.7	60.2	72.5	72.4	**

说明：* 本表系在予处理2小时，以14,000转/分离心30—40分钟，腔温在27—32℃时的试验结果

**细胞在离心过程中脱落严重，且残留的细胞形态较差，无法判定结果。

表2 离心速度对细胞去核的影响

细胞株名	CB浓度（μg/ml）	不同离心速度（转/分）下细胞去核效率（%）		
		8000 rpm	14000 rpm	20000 rpm
次代猴肾细胞	10	24.6	61.2	72.0 **
KMB_{17}人二倍体细胞	5	35.7	98.0	99.0 **
Hela	7	64.7	91.0	88.6 **
宫743	7	75.6	79.0	78.1 **
人胚肾传代细胞系	9	27.5	72.5	79.0 **

说明，* 本表系在予处理2小时，离心时间30—40分钟，腔温在27—32℃时所得结果

**细胞在离心过程中脱落严重，且残留细胞少，形态较差

各种细胞对离心时间的反应不一致。从以上两个因素观察结果得知Hela细胞易在离心时脱落而次代猴肾细胞则很不易脱落。因此，我们选这两种有代表性的细胞对离心时间的反应作了比较。从表3所列结果可看出，次代猴肾细胞对载片的贴附力很强，以14,000转／分的速度离心120分钟时，细胞未见严重脱落，但细胞去核率也未见相应地提高（70%），且其细胞形态不如离心时间控制在60分钟以内好。Hela细胞在离心40分钟时即开始有明显脱落，所以从对各细胞的观察可发现离心时间，每次以30—60分钟为宜。

在离心一次的情况下，对次代猴肾细胞来说不易达到较为理想的去核效果，于是我们改用两次离心，即第一次离心后，将细胞放在无CB的培养液中温育1小时，待细胞

形态恢复后，再将细胞载片放入10μg/ml浓度的培养液处理，再次离心1小时（14,000转/分）。经两次离心后，去核率可达到92%或更高。这和郭仁评述中所提及的见解一致。

表3 离心时间对细胞去核率的影响

细胞株名	CB浓度 (μg/ml)	不同时间离心后的去核率(%)					
		10′	20′	30′	40′	60′	120′
次代猴肾	10	—	—	60	67	78	70
Hela	5	24	63	83	55**	—	—

说明：*在14,000转/分，离心腔温在24—32℃时去核之结果

**细胞脱落严重

3. 离心腔温度对细胞去核率的影响

仍用次代猴肾细胞作试验，在10μg/ml的CB浓度下经两次14,000转/分离心，如离心腔的温度为4°C时，则几乎不能获得去核细胞；当温度升高到8—11°C时，去核率达70%；18—21°C时去核率达94%；27—32°C时达93%。因此，在离心去核时，离心腔温度宜在18—21°C或略高一些，此时离心管内的实际温度为33—37°C。

4. 其它影响因素的观察

我们还对CB培养液予处理细胞的时间，细胞生长的密度，培养液中的牛血清浓度，pH值以及渗透压等5个因素进行了观察，发现将培养细胞的载片放入含CB的培养液中预处理2—4小时，然后再进行离心，可获得较高的去核率。细胞长成疏松单层时，进行去核一般易得较满意的结果，尤其Hela等异倍体传代细胞更是如此。在选用了从牛血清到100%等8种不同的牛血清浓度进行去核观察，发现血清浓度对去核的影响不明显，这和陈瑞铭等关于牛血清可增加去核率的结果不尽一致，也和L²n关于牛血清抑制CB作用的结果不同。此外，培养液的pH值和渗透压在适当范围内改变，也未见对细胞去核有明显影响。

综合我们对所试五种细胞的70多次试验，将各自比较最为适宜的条件及可获得的去核率列于表4。在同样条件下，各种细胞的DMSO对照组去核率>1%。

表4 五种去核细胞的制备条件及可获得的去核率

细胞株名	去核条件				去核率(%)
	CB浓度 (μg/ml)	离心速度 (转/分)	离心时间 (分钟)	离心腔温度 (℃)	
次代猴肾	10	14,000	90×2*	25—30	92
KMB_{17}	5	14,000	30	25—30	98以上
Hela	7	14,000	30	25—30	91
宫743	9	15,000	30	25—30	91
人胚肾	10	14,000	30	25—30	87

说明：次代猴肾细胞离心时间为60′×2，即文中提及的离心两次，每次60′。

（二）去核细胞的一般生物学性质观察

结合去核技术的研究，对所得去核细胞进行了如下一些生物学性质的观察：

1．去核细胞形态的观察

将去核的KMB_{17}细胞载片在离心后立即放在相差显微镜下观察，细胞形态明显改变，几乎所有的细胞都沿离心力作用使核甩脱的方向呈束状或分枝状，胞质拉得细长。当这样的细胞载片放入无CB的正常培养液中37°C20—30分钟后，细胞形态即恢复正常培养时的情况，除观察不到细胞核外，细胞仍呈梭形铺展。

2．去核细胞的存活时间

应用中性红活性染料对去核后的KMB_{17}进行染色观察，在去核后36小时有少数细胞出现死亡征象，48小时后，大部分细胞出现死亡征象，表现为细胞内颗粒与液泡失色，胞质作扩散性染色。即多数去核细胞在正常培养液中可以存活36小时之久。

3.去核细胞中DNA合成的测定

将经去核的KMB_{17}无核细胞载片，用含有^3H胸苷的培养液培养20小时（KMB_{17}的细胞周期约19小时），经处理后，在液体闪烁计数器上计数。表5的结果表明，去核细胞中无^3H胸苷的掺入，即提示它无DNA合成活动。这与国外学者用放射自显影所得结果一致。

表5　　去核细胞及正常细胞合成情况的比较

组　名	用1 μci/ml ^3H胸苷标记20小时后提取计数		
	均数(cpm)	标准误	99.74%可信限范围*
空白闪烁液	31	2.43	23.71—38.29
正常及去核细胞未标记	37	2.58	29.26—44.74
去核细胞标记	34	3.29	24.13—43.87
正常细胞标记	247	8.09	222.73—271.27
标记物对照**	1,040	32.26	943.22—1136.78

说明：*99.74%的可信限范围是均数±3个标准误

**在5 ml/并的闪烁液中按实验组同样的量加入1 μci/ml的^3H胸苷

（三）去核细胞及核体超微结构的观察

我们还对去核后的KMB_{17}的胞质体和胞核体进行了电镜下超微结构的观察。图2显示了去核后30分钟的KMB_{17}细胞的结构，其质膜是完整的，除在胞核位置无胞核外，其他细胞器排列及结构状态均同图1所示的正常有核细胞相似，只是原来细胞核的部位被细胞质所充填。这与Shay等对CHO去核细胞所作的观察一致。图3、4显示在高倍下去核细胞内的主要细胞器。高尔基复合器、线粒体、粗面内质网、中心体等细胞器都清晰可见，结构完好。这提示在去核后的短时期内，去核细胞的生活状况是良好的。

与此同时，我们对去核后收集的核体也进行了观察，见图5、6、7。从图可见，胞核由一薄层胞质包绕，外面有一层完整的质膜。并可见核膜是完整的，核内核仁及染色质的状况是正常的。在薄层胞质中，可见少量线粒体、粗面内质网、内质网池同核膜相通，还可见丰富的游离核糖体。

讨论

我们应用了五种细胞培养物，具体探讨了去核的条件。细胞类型、CB浓度、离心速度与时间、离心腔温度等是去核技术中较为重要的因素；而培养基的成份、血清浓度、pH等因素相对影响较小。就离心腔温度来说，似乎是个恒定不变、不需反复调整的因素，即对不同类型的细胞都需要有较高的温度（20—30°C）方能获得较好的去核效果、而离心速度和时间，对不同类型的细胞则略有不同。当我们需要对一个新的细胞类型进行去核时，可首先考虑采用12,000—15,000转／分、40分钟离心去核较易接近最适条件。CB浓度和预培时间是基本的去核因素，各种细胞对该药物的敏感性不一致。一般的细胞，可首先考虑在5—10μg/ml的CB浓度中37°C预处理2小时的条件去核。总之，只要综合分析和选用适当的条件，就能较容易地获得90％及以上的去核率。这里值得一提的是，我们认为观察细胞传代时胰酶分散的难易和细胞生长时有无接触抑制这两点，在考虑此细胞去核条件时有一定意义。另外，即使按最适条件去核，仍只能获得90—98％的去核细胞，而不能获得100％的去核细胞，这是今后实验中需要进一步研究的问题。

对KMB_{17}去核细胞进行的形态学、存活时间、DNA合成情况及超微结构的观察，提示由此获得的去核细胞，可以用来进行有关细胞生物学的研究和病毒与细胞相互作用的研究。同时，实验所得的核体实际上是一个含有少量胞质的小细胞。虽然这种小细胞不能再生所有的细胞器并演变为正常细胞，但这有利于胞核体离开细胞后能存活一段时间，并为核移植和细胞拆合工程的研究提供了良好的基础。

结语

选用了五种实验室常用的哺乳类细胞（包括二倍体细胞和异倍体细胞）进行去核研究。发现细胞类型、细胞松驰素B浓度、离心速度与时间、离心腔温度等因素对去核效果影响较大。并初步建立了这五种细胞去核的最适条件，在这种条件下可获得90％以上的去核率。同时对KMB_{17}二倍体细胞去核所得的胞质体和胞核体进行了形态学和部分生物学性质的观察，结果提示所得的胞质体可用来进行有关细胞生物学和病毒与细胞相互关系的研究，所得的胞核体可用来进行核移植和细胞拆合工程的研究。

参考文献

吉林医科大学组织胚胎教研室 1975 一种宫颈癌细胞系（宫743）的建立及其特性．吉林医科大学学报 1(3):19—21.

沈鼎武等 1978 去核细胞．生物科学动态 4:10—15

陈瑞铭等 1979 松胞素B和离心术并用制备体外培养哺乳类细胞的核体与胞质体．实验生物学报 12(1):115—117.

杨晓峰 1981 细胞松弛素的几种主要生物学效应．国外医学分子生物学分册 5:217—224.

郭仁 1980 体外培养细胞的去核技术及其在病毒学研究中的应用．中国医学科学院学报 2(1)73—76.

郭　仁等 1981 人二倍体细胞株KMB₁₇的特性．中国医学科学院学报 3（4）:226—229。
童第周等 1963 细胞核的移植．动物学报15(1):151—167。
Carter, S, 1967 Effects of Cytochalasins on Mammalian Cells, *Nature* (London) 213:261-264.
Poste, G. 1973 Anucleate Mammalian Cell, Applications in Cell Biology and Virology, Methods in Cell Biology (Prescott D. ed., *Academic Press*) 7:211—249.
Poste, G. et al. 1978 Enucleation of Cultured Animal Cells by Cytochasin B. In, Cytochalasins, Biochemical and Cell Biological Aspects (Tanenbaum, S. ed., *Elsevier/North-Holland Biomedical Press*), Ch. 8, 161-189.
Prescott, D. et al. 1972 Enucleation of Mammalian Cells With Cytochalasin B. *Exp. Cell Res.* 71:480-485.
Pringle, C. 1977 Enucleation as a Technique in the Study of Virus-Host Interactions. *Curr. Top. Microbio. Immunol.* 76:49-82.
Reeve, P. et al. 1971 Studies on the Cytophathic Effects of Newcastle Disease Virus, Metabolic Requiremens. *J. Gen. Virol.* 11:25-34.
Shay, J. et al. 1974 The Surface Morphology and Fine Structure of CHO (Chinese Hamster Ovary) Cells Follo wing Enucleation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71(8):3059-3063.
Tanenbaum, J. 1978 Approaches to the Molecular Biology of Cytochalasin Action. In, Cytochalasins, Biochemcal and Cell Biological Aspects (Tanenbaum, S. ed., *Elsevier/North-Holland Biomedical Press*) Ch. 17:521-559.
Wise, G. et al. 1973 Ultrastructure of Enucleated Mammalian Cells in Culture. *Exp. Cell Res.* 81:63-72.

A STUDY OF ENUCLEATION FOR CULTURED MAMMALIAN CELLS IN VITRO

Yan Xiaofeng　Guo Ren　Zhuang Junying
Zhang Xinsheng　Xu Weimin

(Institute of Medical Biology, the Chinese Academy of Medical Sciences, Kunming)

For a long time, cell biologists and virologists have been trying to find a good way by means of which the relationship between the mammalian cell nucleus and the cytoplasm and the problem concerning the roles of the two main parts during virus replication may be studied. Following Carter' report in 1967 that Cytochalasin B (a metabolite of the mould) may induce the cultured cells to enucleate. Prescott devised a method of mass enucleation by centrifugation in Cytochalasin B. Since articles about this method have scarcely been published in our country, and in order to put it to use widely, we have selected five kinds of cells which are often used in our laboratory, and observed the enucleating conditions and the biological properties of the enucleated cells.

The five kinds of cells we selected are as follows, subcultured monkey ki-

dney cells; a human fetal lung diploid cell strain KMB-17; a human fetal kidney cell line and two cervix carcinoma cell lines (HeLa. Gung743). All the cells are grown in the 199 medium supplmented with 10% calf serum, pH7.2. When enucleating, the coverslips where the tested cells are grown as submonolayer are positioned with the cell facing the bottom of the centrifuge tubes. The medium, prewarmed to 37°C and containing required concentrtions of CB, is kept in the centrifuge tubes. After some hours, centrifugation is carried out according to the predetrmined speed and time. And then, the coverslips are removed from the centrifuge tubes, and incubated in CB-free medium at 37°C for half an hour, The coverslips are fixed with methyl alcohol, and stained with Giemsa. The enucleate precentage is examined under an optical microscope.

After repeated experiments, we have found that CB concentrations, centrifuge speeds, centrifuge time and centrifuge chamber temperatures are the major factors affecting the efficiency of enucleation, and all other factors are of minor importance. 5-10ug/ml of CB, 2 hours for pretreating time, cells grown as submonolayer. centrifuge speed 12,000-15,000 rpm, centrifuging for 30-60 minutes every time and 20-30°C of centrifuge chamber tempereture are the optimal conditions for enucleation, with which we have succeed in making 90% or more of these cells enucleate. At the same time, we have observed that return of the enucleated cells to normal norphology is completed in CB-free medium in 30 minutes. The neutral red staining of the enucleated cells shows that they can survive in vitro for 36 hours. Inverstigation of the results of the ^{3}H-thymidine incorporated into the enucleated cells by means of a liquid scintillation counter shows that there is no DNA synthesis in the enucleated cells. Moreover, by using an electronic micros cope, we have also observed the ultrastructure of the cytoplasts and the karyoplasts of KMB-17 cell strain collected 30 minutes after enucleation by centrifugation in Cytochalasin B. The results demonstrate that the cytoplasts are normal anucleate cells. In the cytoplasts, all the cytoplasmic organelles are present except the cell nucleui, while the karyoplasts are intact nucleui possessing normal fine structure and enclosed by a small amount of cytoplasm.

Through many experiments, we realize that the heteroploid cells adhere loosely to the coverslips and pile up during the growth, so they are apt to detach themselves and get lost. The enucleation conditions of the cells should therefore be carefully considered. We believe that the enucleation by centrifugation in Cytochalasts B is a good method, and the enucleate cells and the karyoplasts obtained in this way are good means by which cell biology, virology and cell engineering may be studied in our country.

杨晓峰等：体外培养哺乳类细胞去核的研究

Yang Xiaofeng et al. A Study of Enucleation for Cultured Mammalian Cells in vitro

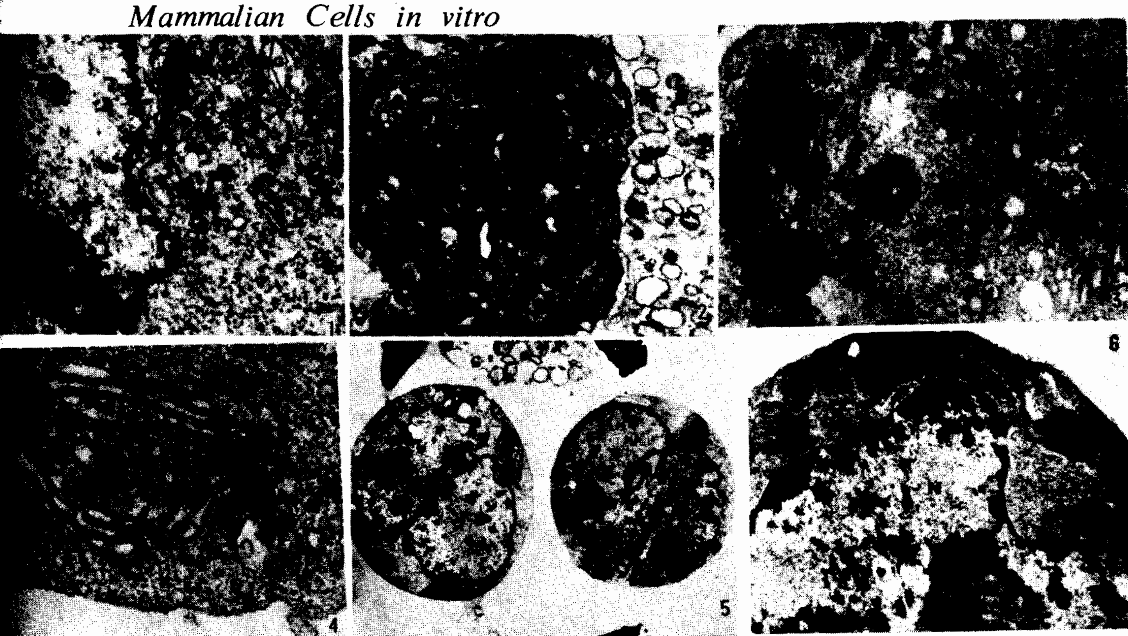




图1　体外培养的正常人二倍体细胞电镜图，可见细胞核（*N*），和明显的核仁（*Nu*），并可见中心体（*Ce*），高尔基复合器（*G*），线粒体（*M*）及粗面内质网（*ER*）等细胞器。×21,600

图2　去核30分钟后的人二倍体无核细胞，低倍，可以看到二倍体正常细胞的细胞质的形态结构。×12,000

图3　部分去核细胞的高倍图，可见线粒体及粗面内质网，中心体，有时也可见到微丝（*MF*）和微管（*MT*）。×42,000

图4　部分去核细胞，可见清晰的高尔基复合器细胞。×76,000

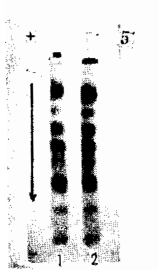
图5　经过离心去核之后所得的细胞核，低倍。两个都呈双叶核，核膜与核仁很清楚。在细胞核外还带出一薄层胞浆，其中可见少量线粒体及粗面内质网等细胞器。×7,200

图6　部分游离细胞核的高倍图。细胞核从细胞中脱出时带出一部分胞浆，胞浆周边有一层质膜，在胞浆中看到几个线粒体和粗面内质网。×22,400

图7　另一细胞核之一部分。图示胞浆中具有丰富的核糖体（*Ri*），并可见内质网池同核膜相通（⇨）。23,200

周新华：辽宁产东亚钳蝎毒两种毒素的纯化及其部分性质的研究

Zhou Xinhua. The Isolation, Purification and Some Properties of two Toxins from the Scorpion Venom of Buthus martensii Karshi from Liaoning



]5.粗毒 *pH*4.5圆盘电泳图谱
为150 *ug*，2 为200*μg*.

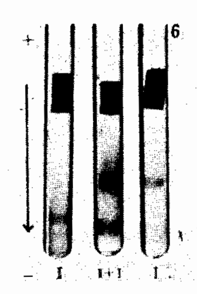
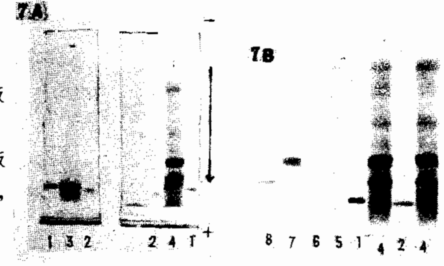


图6.毒素Ⅰ　毒素Ⅱ，毒素Ⅰ＋Ⅱ　*pH*4.5圆盘电泳图谱。

图7.

A: *SDS*—不连续板电泳纯度鉴定

B: *SDS*—不连续板电泳测定毒素Ⅰ，Ⅱ分子量



图中，1.*Toxin* Ⅰ；2.*Toxin*Ⅱ；3.*Crude Venom*
4.*Mixd protein*（*BSA*、*OA*、*TRY*、*RNE*
CYT、*Toxin* Ⅰ，*Toxin* Ⅱ）；5.*OA*；6.*TRY*；
7.*RNE*；8.*CYT*。